

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11)

Veröffentlichungsnummer:

**0 387 527
A1**

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 90102685.6

(22) Anmeldetag: 12.02.90

(51) Int. Cl.⁵: C12N 15/11, C12P 13/03,
C12N 1/21, C07H 21/04,
/(C12N1/21,1:15),(C12N1/21,
C12R1:13)

(30) Priorität: 14.03.89 DE 3908201

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
19.09.90 Patentblatt 90/38

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE DE ES FR GB IT NL

(71) Anmelder: Degussa Aktiengesellschaft
Weissfrauenstrasse 9
D-6000 Frankfurt am Main 1(DE)

(72) Erfinder: Bachmann, Bernd, Dr.
Meyerfeld 10a
D-4806 Werther(DE)
Erfinder: Thierbach, Georg, Dr.
Gunststrasse 21
D-4800 Bielefeld(DE)
Erfinder: Kalinowski, Jörn
Drögestrasse 25
D-4800 Bielefeld(DE)
Erfinder: Pühler, Alfred, Prof. Dr.
Am Waldschlösschen 2
D-4800 Bielefeld(DE)

(54) Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Lysin.

(57) Verfahren zur Herstellung von L-Lysin, bei dem man rekombinante DNA, die aus einem DNA-Fragment, das eine für die Produktion von Proteinen, die zu einer Aspartyl- β -semialdehyd-Dehydrogenase (asd) Aktivität bzw. zur Deregulation der Aspartat-Kinase (lysC) führen, kodierende genetische Sequenz ausweist, die von einem Mikroorganismus der Gattung Corynebacterium oder Brevibacterium stammt, und aus Vektor DNA besteht, in einen Mikroorganismus der Gattung Corynebacterium oder Brevibacterium inseriert, den so erhaltenen Transformanten in einem geeigneten Medium züchtet und das gebildete L-Lysin daraus abtrennt.

EP 0 387 527 A1

Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Lysin

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Lysin.

Corynebacterium glutamicum und verwandte Gattungen wie z. B. *Brevibacterium lactofermentum* und *Brevibacterium flavum* sind als Aminosäuren bildende Mikroorganismen bekannt.

Um die Produktivität zu erhöhen, führt man künstliche Mutationen durch.

- 5 Beispiele für so erzeugte künstliche Mutanten sind z. B. Lysin produzierende Stämme von *Corynebacterium glutamicum*, die neben einer AEC-Resistenz (AEC $\hat{=}$ S-2-Aminoethylcystein) eine damit gekoppelte Homoserin- und Leucin-Auxotrophie (US-PS 3 708 395) zeigen oder sensitiv gegenüber Methionin sind (US-PS 3 871 960).

- Neben dieser klassischen Methode wurden Vektorsysteme entwickelt, die die Transformation von
10 Mikroorganismen der Gattungen *Corynebacterium* und *Brevibacterium* ermöglichen (DE-OS 3737719, DE-OS 3841453, Thierbach G., Schwarzer A., Pühler A, Appl. Microbiol. Biotechnol. 29 (1988) 356-362).

In der EP-A-0219 027 wird ein Verfahren zur Herstellung verschiedener Aminosäuren beschrieben, bei dem man mit rekombinanter DNA Mikroorganismen der Gattungen *Corynebacterium* und *Brevibacterium* transformiert und so die Ausscheidungs- menge von Aminosäuren erhöht.

- 15 Die rekombinante DNA enthält dabei ein für die Synthese von Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase oder Aspartataminotransferase kodierendes DNA-Fragment.

Aus der US-PS 4,346,170 ist die Klonierung einer die Lysinbildung kontrollierenden genetischen Information in *E. coli* bekannt, die aus einem Stamm derselben Gattung mit einer Resistenz gegen eine L-Lysin-analoge Verbindung wie z.B. AEC stammt.

- 20 Der Gegenstand der US-PS 4,560,654 liegt auf demselben Gebiet. In diesem Fall wird jedoch in einem Lysin-auxotrophen Stamm von *Corynebacterium glutamicum* eine genetische Information aus einem AEC-resistenten Stamm derselben Gattung kloniert mit der Folge, daß Lysin ausgeschieden wird.

Die Identität des klonierten DNA-Fragments wird nicht offenbart.

- Auch der EP-A-88166 ist nur zu entnehmen, daß ein Stamm von *C. glutamicum* Lysin ausscheidet,
25 nachdem er durch Transformation den Phänotyp der AEG-Resistenz erworben hat.

Das für diesen Zweck eingesetzte rekombinante Plasmid pAec5 enthält ein 3,9 kb Fragment chromosomaler DNA eingefügt an der BglII-Schnittstelle des Vektors pCG 11.

- Aufgabe der Erfindung ist, die Regulierbarkeit eines wichtigen Enzyms der Lysin-Biosynthese in einem Mikroorganismus der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* so zu verändern, daß entweder eine
30 Lysin-ausscheider resultiert oder die Rate der Lysin-Ausscheidung erhöht wird.

- Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von L-Lysin, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man rekombinante DNA, die aus einem DNA-Fragment, das eine für die Produktion von Proteinen, die zu einer Aspartyl- β -semialdehyd-Dehydrogenase (asd) Aktivität und/oder zur Deregulation der Aspartat-Kinase (lysC) führen, kodierende genetische Sequenz aufweist, die von einem Mikroorganismus der Gattung
35 *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* stammt, und aus Vektor DNA besteht, in einen gegebenenfalls Lysin-produzierenden Mikroorganismus der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* inseriert, den so erhaltenen Transformanten in einem geeigneten, an sich bekannten Medium züchtet und das gebildete L-Lysin daraus mit bekannten Methoden abtrennt.

- Als Donorstämme können alle, bevorzugt L-Lysin produzierende Bakterien der Gattung *Brevibacterium*
40 und *Corynebacterium* dienen, die die entsprechenden DNA-Sequenzen enthalten, insbesondere aber *Corynebacterium glutamicum* DM 58-1, das durch Mutagenese von *Corynebacterium* ATCC 13032 mit Ethylmethansulfonat entwickelt wurde und AEG-Resistenz zeigt.

- Dieser Stamm ist unter der Nummer DSM 4697 hinterlegt, wo er als Wirtsbakterium für das Plasmid pDM6 dient. Dieses kann der Fachmann nach bekannten Verfahren abtrennen und so den Stamm DM58-1
45 erhalten. (FEMS Microbiology Review 32 (1986) 149-157)

Die chromosomale DNA wird aus dem Donor auf bekannte Weise extrahiert und mit Restriktionsendonucleasen behandelt.

- Nach der Konstruktion der rekombinanten DNA durch Einführung des chromosomalen DNA-Fragments in einen Vektor erfolgt die Transformation des Mikroorganismus mit dem so gewonnenen Plasmid, erfindungs-
50 gemäß beispielsweise mit pCS2, dessen Restriktionskarte in Abb. 2 dargestellt ist, und das in dem Stamm *Corynebacterium glutamicum* DM2-1/pCS2 unter der Nummer DSM 5086 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen nach dem Budapester Abkommen hinterlegt wurde.

Ein bevorzugtes Vektorsystem stellt pZ1 (hinterlegt in *Corynebacterium glutamicum* DM 274-2 unter der Nummer DSM 4241) dar oder auch pCV34, pCV36, pCVX4, pCVX10, pCVX15, pZ9 und pZ8-1 (DE-OS 3841 454.6) oder pCV35, pECM3, pECM1 (DE-OS 3841 453.8).

Verwendbar sind aber auch die aus der EP-A-93 611 bekannten zusammengesetzten Plasmide, soweit sie in Corynebakterien oder Brevibakterien selbst replizieren, insbesondere pAJ 655, pAJ 611, pAJ 440, pAJ 1844 und pAJ 3148 aber auch pCG 11, pCE 54 (s. EP-A 0 233 581), ebenso pUL330 (Santamaria, R.I. et al., J. Bacteriology 162 (1985) 463-467).

5 Gegenstand der Anmeldung sind ebenso die rekombinante DNA enthaltenden Mikroorganismen der Gattungen Corynebacterium oder Brevibacterium und ihre Verwendung zur Herstellung von L-Lysin durch Fermentation.

Das klonierte DNA-Fragment (s. Abb. 2) enthält nur einen Bruchteil des Aspartat-Kinase Gens (lysC) sowie das vollständige Gen der Aspartyl- β -semialdehyd-Dehydrogenase (asd), wie aus der Sequenzanalyse
10 erkennbar ist.

Der Bruchteil dieses Aspartat-Kinase Gens besitzt eine zur β -Untereinheit der Aspartat-Kinase II aus B.subtilis homologe DNA-Sequenz.

Alle Transformanten, deren Plasmid diese Sequenz aufweist (pCS2, pCS21, pCS22, pCS23, pCS24, pCS26, pCS233), enthalten eine verglichen mit dem chromosomal codierten Enzym aus ATCC 13032
15 bezüglich der feed-back Inhibitoren L-Lysin und L-Threonin deutlich desensibilisierte Aspartatkinase und zeigen AEC-Resistenz.

Die aus Homologievergleichen gezogenen Schlüsse nach denen das Pst I - XhoI Genfragment aus DM58-1 nur ein Teil des lysC Gens (AK), aber das vollständige asd-Gen beherbergt, konnten durch Enzymmessungen eindeutig bestätigt werden.

20 Kein mit pCS2 oder einem pCS2-Derivat transformierter C.glutamicum ATCC13032 Stamm enthält überraschenderweise eine gegenüber dem Empfängerstamm erhöhte Aspartat-Kinase Aktivität (Tabelle 4, Spalte 3).

Demgegenüber ist in allen Transformanten, deren Plasmide das asd-Strukturgen enthalten, eine starke Überexpression der Aspartyl- β -semialdehyd-Dehydrogenase (ASA-DH) nachweisbar (Tabelle 4, Spalte 2,
25 Abb. 3 und 4). Die Plasmide pCS23 und pCS23-Derivate fñhrend erwartungsgemäß nicht zu einer Überexpression der ASA-DH.

Die bei Klonierung des erfindungsgemäßen DNA-Fragments mit Hilfe von pCS 2 und daraus abgeleiteten Derivaten eintretende starke Überexpression der ASA-DH gewährleistet eineeffiziente Umsetzung des Produkts der Aspartat-Kinase Reaktion, dem β -Aspartylphosphat, wodurch eine Beschleunigung der nicht
30 mehr inhibierbaren Aspartat-Kinase Reaktion eintritt.

Aufgrund der hohen Labilität der ASA-DH schwanken die Faktoren der aus der spezifischen Aktivität kalkulierbaren Überexpression von 31 - 65.

Gegenüber dem Stand der Technik ergibt sich eine wesentliche Vereinfachung daraus, daß erstens nur ein Bruchteil des lysC Gens, der zu einer Deregulation der Aspartat-Kinase führt, isoliert werden muß, um
35 eine Lysin-Ausscheidung zu bewirken oder zu verbessern, und zweitens aufgrund der Organisation von lysC und asd in einem Operon so dass, das asd-Gen ohne zusätzlichen exp. Aufwand aufgrund der mit dem mutierten lysC-Gen auftretenden AEC-Resistenz zusammen mit dem lysC-Gen isoliert werden kann. Umgekehrt kann mit Hilfe von asd-Mutanten das lysC + asd enthaltende DNA-Fragment isoliert werden und zwar unabhängig davon, ob lysC mutiert ist oder nicht.

40

1. Charakterisierung des Genspenders DM58-1 und Genempfängers ATCC13032

45 1.1 Entwicklung und Phänotyp des Stammes DM58-1

Der Stamm DM58-1 wurde durch Mutagenese von Corynebacterium glutamicum Stamm ATCC13032 mit einer üblichen Konzentration an Ethylmethansulfonat entwickelt.

Die Selektion erfolgte durch Ausplattieren des so erhaltenen Mutantengemischs auf Minimal-Agar der
50 Zusammensetzung 20 g Glucose; 10 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2,5 g Harnstoff; 1 g KH_2PO_4 ; 0,4 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,5 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 300 μg Biotin; 900 μg Thiamin und 20 g Agar pro 1 Aquadest (pH 7,0), der eine geeignete Konzentration an 5-Aminoethyl-D,L-Cystein (AEG) enthielt. Ein auf diesem Medium teilungsfähiger von einem solchen Selektionsmedium isolierter Klon, später als DM58-1 bezeichnet, trägt neben seiner AEC-Resistenz keine weiteren genetischen Marken.

55

1.2 Enzymgehalte an Aspartat-Kinase und Aspartyl-beta-semialdehyd Dehydrogenase in ATCC13032 und DM58-1

Die Stämme ATCC13032 und DM58-1 wurden unter direkt vergleichbaren Bedingungen in Standard I Bouillon (Merck Art. Nr. 7882) mit zusätzlichen 4 g/l Glucose und 1 mM MgCl_2 bei 30°C und 150 rpm bis zum Erreichen der früh stationären Phase kultiviert und durch Zentrifugation vom Kulturmedium getrennt. Man wäscht 3 Mal mit 100 mM Tris/HCl (pH 7,5); 1 mM DTT und suspendiert die Feuchtzellmasse in einem

5 Volumenteil des gleichen Puffers.

Die so suspendierten Zellen wurden in einer Kugelmühle (B. Braun Melsungen - MSK-Homogenisator, IMA-Disintegrator S) durch Verrühren mit einer geeigneten Menge an Glasperlen aufgeschlossen. Das Zellhomogenat wurde mittels Glasfilternutsche von den Glasperlen getrennt und 30 Minuten bei 30000 x g klarzentrifugiert.

10 Nach 15stündiger Dialyse in Enzym-stabilisierendem Puffer wurden die Enzymaktivitäten in folgenden Testgemischen bestimmt:

Aspartat-Kinase Test: 100 mM Tris/HCl (pH 7,5), 1 mM DTT, 400 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 mM MgCl_2 , 400 mM $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$, 300 mM L-Aspartat, 40 mM ATP und verschiedene Mengen Enzympräparation.

Durch Zugabe von 750 μl einer Lösung aus 10 % $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 3,3 % TCA; 0,7 N HCl zu 500 μl des Enzymtestgemisches wird die Enzymreaktion nach 30 minütiger Inkubation bei 37°C gestoppt. Aus der

15 mittels Eichkurvenverfahren photometrisch ($\Delta E_{540 \text{ nm}}$) bestimmten Aspartyl-beta-Hydroxamat Konzentration wird die in $\mu\text{Mol/mg} \cdot \text{min}$ (U/mg) angegebene Enzymaktivität kalkuliert. Die zugehörigen Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Lowry et al. (Lowry et al. J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)) oder Bradford (Bradford Anal. Biochem. 72, 248 (1976)) durchgeführt. Der Aspartyl- β -semialdehyd Dehydrogenase Test enthält 120 mM Diethanolamin (pH 9,0); 40 mM NaAsO_4 ; 1 mM NADP^+ ; 5 mM L-Threonin; 1,3 mM

20 Aspartyl-beta-semialdehyd und verschiedene Mengen Enzympräparation in einem Gesamtvolumen von 1 ml. Die in $\mu\text{Mol/mg} \cdot \text{min}$ (U/mg) angegebene Aktivität wird über die photometrisch ($\Delta E_{540 \text{ nm}}$) bestimmte NADPH Synthesegeschwindigkeit berechnet.

Tabelle 1 enthält die spezifischen Enzymaktivitäten beider Enzyme in Rohextrakten identisch gezogener und aufgearbeiteter Zellen von *C. glutamicum* ATCC13032 und DM58-1. Neben vergleichbaren

25 Gehalten an Aspartat-Kinase beider Stämme enthält die AEG resistente Mutante DM58-1 im Vergleich zum Wildtyp ca. 5fach erhöhte Aspartyl- β -semialdehyd Dehydrogenase Aktivität.

30 1.3 In vitro Hemmbarkeit der Aspartat-Kinase aus *C. glutamicum* ATCC13032 und DM58-1

Tabelle 1 zeigt, dass die bereits von K. Nakayama et al. (K. Nakayama et al. Agr. Biol. Chem. 30, 611 (1966)) angedeutete und von S.N. Kara-Murza et al. (S.N. Kara-Murza Prikladnaya Biokhimiya; Mikrobiologia 14, 345 (1978)) genauer untersuchte Hemmbarkeit des *C. glutamicum* Wildtyp-Enzyms durch uns reproduziert werden konnte. Dem gegenübergestellt ist der deutlich differente Charakter des Enzyms der AEC

35 resistenten Mutante DM58-1, deren Aspartat-Kinase nicht mehr konzentriert durch L-Lysin + L-Threonin hemmbar ist. Durch die am Enzym aus ATCC13032 Lysin-analog wirkenden Substanzen S-Aminoethyl-D,L-Cystein (AEC) wird das Enzym der Mutanten ebenfalls nur noch gering beeinflusst.

40

45

50

55

Tabelle 1

Enzymgehalt und Eigenschaften von Aspartat-Kinase (AK) und Aspartyl- β -semialdehyd Dehydrogenase (ASA-DH) aus <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 und DM58-1		
Stamm	ATCC13032	DM58-1
AK (U/mg)	0,013	0,011
ASA-DH (U/mg)	0,06	0,33
Hemmstoff-Kombinationen	AK-Hemmung (%)	
10 mM L-Lys	89	12
1 mM		
10 mM L-Lys	95	2
10 mM L-Thr		
100 mM L-Lys	99	21
10 mM L-Thr		
10 mM AEC	12	0
1 mM L-Thr		
10 mM AEC	41	0
10 mM L-Thr		
100 mM AEC	95	7
10 mM L-Thr		
Abkürzungen: AEC S-(Aminoethyl)-D,L-Cystein		

2. Klonierung eines DNA-Fragments von *C. glutamicum* Stamm DM58-1, das für eine feed-back resistente Aspartat-Kinase kodiert.

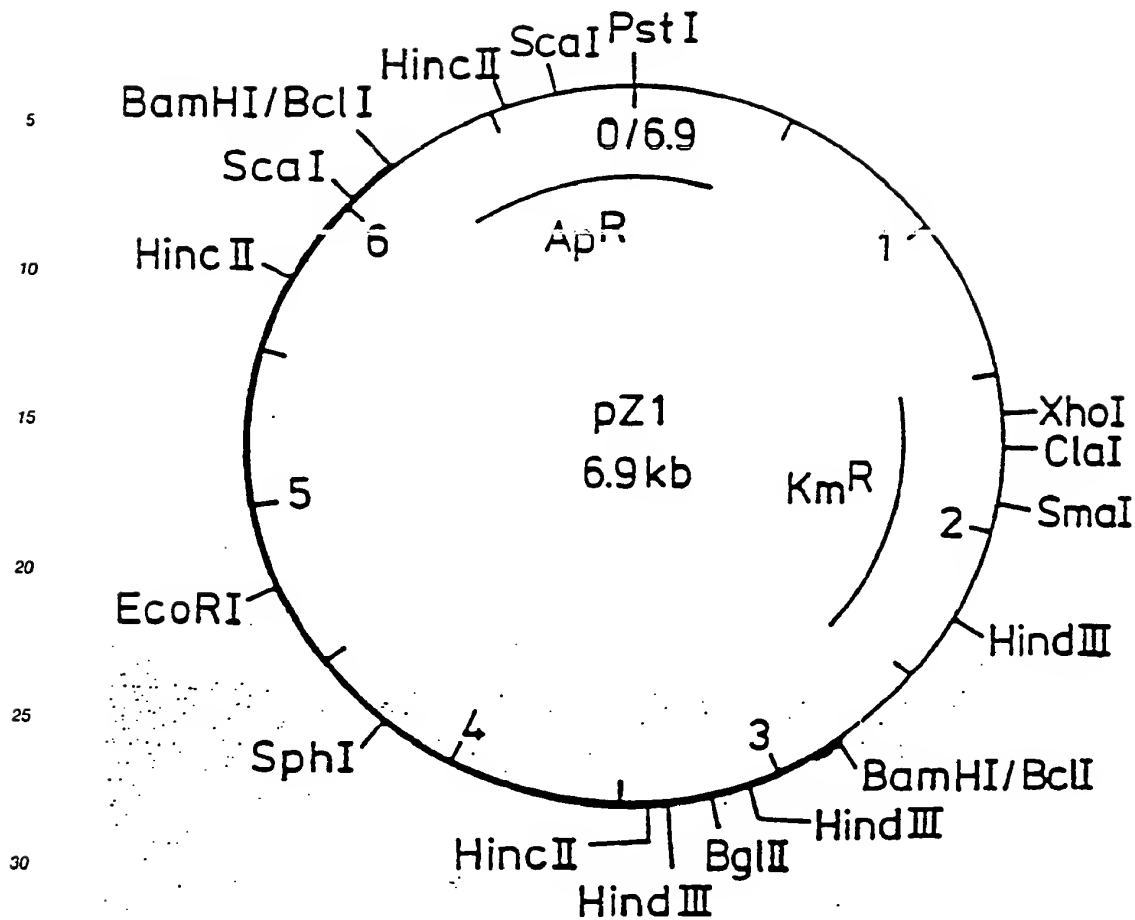
2.1 Klonierung

Gesamt-DNA wurde aus *C. glutamicum* Stamm DM58-1, wie bei Chater et al. (Chater et al. Curr. Topics Microb. Immunol. 96, 69 (1982)) beschrieben, isoliert und partiell mit dem Restriktionsenzym PstI verdaut. Der vektor pZ1 (Abb. 1), der in der Deutschen Patentanmeldung 3737729.9 beschrieben ist, wurde mit PstI linearisiert und durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Vektor-DNA und DM58-1 DNA wurden gemischt und mit T4 DNA-Ligase, wie bei Maniatis et al. (Maniatis, T et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory 1982) beschrieben, behandelt.

Die Transformation von *C. glutamicum* ATCC13032 mit dem Ligationsgemisch erfolgte, wie bei Thierbach et al. (Thierbach G. et al. Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356 (1988)) beschrieben.

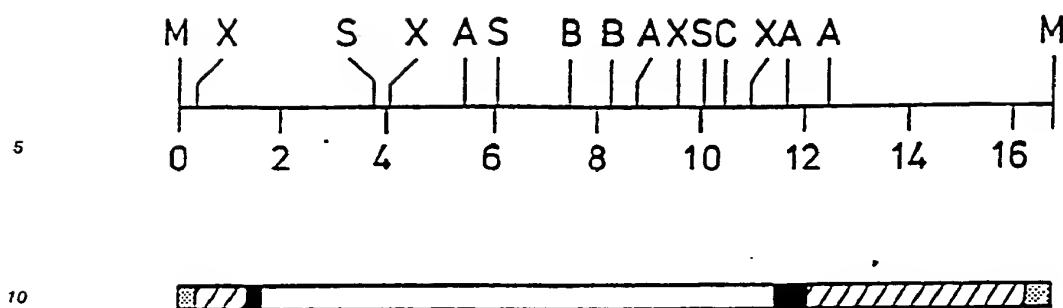
Abbildung 1: Restriktionskarte des Plasmids pZ1.

Der dick gezeichnete Strich stellt den pHM1519-Anteil, und der dünn gezeichnete Strich stellt den pACYC177-Anteil von pZ1 dar. Ap^R: Ampicillin-Resistenzgen; Km^R: Kanamycin-Resistenzgen.



Das Transformationsgemisch wurde auf RCG/E-Agar mit 300 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin ausplattiert und die Agarplatten eine Woche bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Agarplatten auf MM-Agar (Katsumata R. et al. J. Bact. 159, 306 (1984)) mit 50 mM AEG und 50 mM L-Threonin übergestampelt und einen Tag bei 30°C bebrütet. Eine Kolonie, die auf diesem Agar wachsen konnte wurde auf MM-Agar, der zusätzlich AEG, L-Threonin und 10 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin enthielt, ausgestrichen, um Einzelkolonien zu erhalten. Plasmid DNA wurde aus einem derartigen Klon isoliert, als pCS2 bezeichnet und zur Transformation von *C. glutamicum* ATCC13032 verwendet. 59 von 62 überprüften Kanamycin-resistenten Transformanten erwiesen sich als resistent gegenüber der Hemmung durch 50 mM AEC und 50 mM L-Threonin. Das Plasmid pCS2 wurde weiterhin durch Restriktionskartierung charakterisiert. Es enthält eine ca. 9.9 kb lange Insertion in der PstI-Schnittstelle des vektors pZ1, der eine Länge von 6,9 kb hat. Die Restriktionskarte von pCS2 ist in Abbildung 2 dargestellt.

Abbildung 2: Restriktionskarte des Plasmids pCS2 in linearisierter Form.



Der obere Teil der Figur gibt die Position der verschiedenen Restriktionsschnittstellen wieder. Im unteren Teil der Figur sind verschiedene Regionen von Plasmid pCS2 dargestellt. Die Insertionen von DM58-1 DNA ist als offener Balken dargestellt. Das Ampicillin-Resistenzgen von pZ1 ist schwarz hervorgehoben, das Kanamycin-Resistenzgen ist durch Punktierung gekennzeichnet. Die übrigen pZ1-Anteile von pCS2 sind durch Schraffur hervorgehoben. Abkürzungen: BamHI, B; BclI, C; Sall, S; ScaI, A; Smal, M; XhoI, X.

2.2 Charakterisierung der Aspartat-Kinase-Aktivität

Aspartat-Kinase-Aktivität wurde in Stamm ATCC13032/pCS2, als positive Kontrolle in Stamm DM58-1 und als negative Kontrolle in Stamm ATCC13032 gemessen. Die Stämme wurden in Standard I Bouillon, das mit 4 g/l Glucose, 10 µg/ml Kanamycin und 1 mM MgCl₂ supplementiert war, kultiviert. Kulturbedingungen, Zellernte, Zellaufschluß und Bestimmung der Aspartat-Kinase wurden, wie unter 1.2 beschrieben, durchgeführt. Die Effektoren L-Lys, L-Thr und AEC werden jeweils als Stammlösungen in 100 mM Tris/HCl Puffer mit einem pH von 7,5 zugegeben.

Aspartat-Kinase-Gehalt und Hemmbarkeit des Enzyms aus ATCC13032/pCS2 sind in Tabelle 4 dargestellt. Obwohl der Stamm keine erhöhte spezifische Aktivität zeigte, konnte eine deutliche Desensibilisierung gegenüber den genannten Hemmstoffen nachgewiesen werden, deren Ausmaß den Grad der Deregulation des Enzyms aus dem Genspender DM58-1 allerdings nicht erreicht (partielle Deregulation).

2.3 Bestimmung der L-Lysin-Ausscheidung

Die Fähigkeit, Lysin auszuschcheiden, wurde in Stamm ATCC13032/pCS2 und als negative Kontrolle in Stamm ATCC13032/pZ1 bestimmt. Nach Zusatz von 10 µg/ml Kanamycin wurde die Kultur, wie unten beschrieben, durchgeführt. Das Ergebnis des Versuches ist in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2

Ausscheidung von L-Lysin durch verschiedene C. glutamicum Stämme.	
C. glutamicum Stamm	Konzentration an ausgeschiedenem L-Lysin*HCl (g/l)
ATCC13032/pZ1	0,0
ATCC13032/pCS2 (≡ DM 2-1/pCS2)	7,1

Ein 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen wird dabei mit 10 ml des folgenden Kulturmediums befüllt: 12 g/l Ammoniumsulfat, 240 g/l Melasse, 60 ml/l Sojamehlhydrolysat und 10 g/l CaCO₃. Nach Animpfen werden die Kulturen 72 Stunden bei 30°C und 300 rpm inkubiert. Die Lysin-Bestimmung erfolgte im zentrifugierten Überstand mit Hilfe von Aminosäureanalysatoren.

3. D letionskartierung des DNA-Fragments von pCS2, das für eine feed-back resistente Aspartat-Kinase k diert.

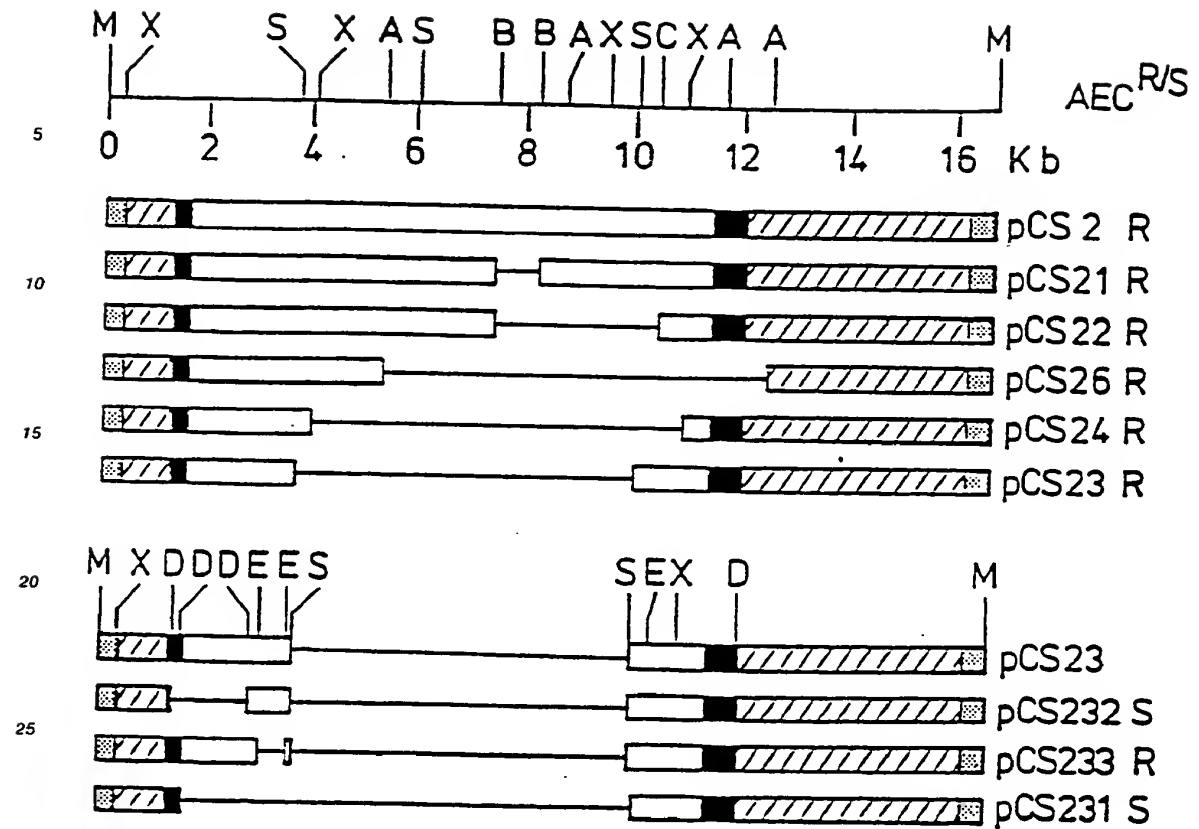
Durch vollständige oder partielle Verdauung von pCS2 mit verschiedenen Restriktionsenzymen und anschließender Behandlung mit T4 DNA-Ligase bei niedriger DNA Konzentration wurden verschiedene Deletionsderivate konstruiert. Die Herstellung der verschiedenen Deletionsderivate ist in Tabelle 3 zusammengefaßt und die Position der Deletionen in den verschiedenen Derivaten in Abbildung 3 dargestellt. In Abbildung 3 ist ebenfalls das Resistenzverhalten der von *C. glutamicum* ATCC13032 abgeleiteten Stämme gegenüber AEC eingetragen. Auf diese Weise konnte die AEC-Resistenz vermittelnde DNA-Region auf ein ca. 1,5 Kb langes DNA Fragment eingegrenzt werden, welches in Plasmid pCS233 durch die PstI-Klonierschnittstelle und eine EcoRI-Schnittstelle begrenzt wird.

Die Aspartat-Kinase-Aktivität und die Hemmbarkeit der Enzymaktivität durch Mischungen von Lysin bzw. AEC und Threonin wurde in den konstruierten Klonen bestimmt. Anzucht, Aufschluß und Aktivitätsbestimmung wurden, wie oben beschrieben, durchgeführt. Außerdem wurde die Fähigkeit der verschiedenen Klone untersucht, L-Lysin auszuschcheiden. Hierfür wurde ein Agarplatten-Diffusionstest mit einem L-Lysin-auxotrophen Indikationsstamm von *C. glutamicum* verwendet. Aus Tabelle 4 ist zu entnehmen, daß sämtliche AEC resistenten Stämme eine partiell deregulierte Aspartat-Kinase-Aktivität besitzen und in der Lage sind, L-Lysin auszuschcheiden.

Tabelle 3

Herstellung und AEC ^{R/S} -Phänotyp verschiedener Deletionsderivate des Plasmids pCS2		
Plasmid	Konstruktion	AEC ^{R/S} -Phänotyp
pCS21	hergestellt nach Verdauung von pCS2 mit BamHI	R
pCS22	hergestellt nach Verdauung von pCS2 mit BamHI und BclI	R
pCS23	hergestellt nach partieller Verdauung von pCS2 mit Sall	R
pCS24	hergestellt nach partieller Verdauung von pCS2 mit XhoI	R
pCS26	hergestellt nach Verdauung von pCS2 mit Scal	R
pCS231	hergestellt nach partieller Verdauung von pCS23 mit PstI	S
pCS232	hergestellt nach partieller Verdauung von pCS23 mit DraI	S
pCS233	hergestellt nach partieller Verdauung von pCS23 mit EcoRI	R
Zeichenerklärung: R = Resistenz, S = Sensitivität		

Abbildung 3: Deletionskarte des Plasmids pCS2



30 Der obere Teil der Figur zeigt die von pCS2 abgeleiteten Derivate der untere Teil zeigt die von pCS23
 abgeleiteten Derivate. Das Ampicillin Resistenzgen von pZ1 ist schwarz hervorgehoben; das Kanamycin
 Resistenzgen ist gepunktet dargestellt; die übrigen pZ1 Anteile von pCS2 sind durch Schraffur gekenn-
 35 zeichnet. Die Insertion von DM58-1 DNA ist als offener Balken dargestellt. Die Deletionen sind als Strich
 gekennzeichnet. Abkürzungen: BamHI, B; BclI C; DraI, D; EcoRI, E; Sall, S; Scal, A; SmaI, M; XhoI X:

Tabelle 4

Stamm	Mikrobiologische und biochemische Charakterisierung rekombinanter C. glutamicum Stämme							
	ASA-DH (U/mg)	AK (U/mg)	AK Restaktivität (%) In Anwesenheit von				AEC ^R	Lysin-Auscheidung
			10mM Lys 1mM Thr	10mM Lys 10mM Thr	100mM Lys 10mM Thr	100mM AEC 10mM Thr		
ATCC13032 (pZ1)	0,06	0,016	9	5	3	7	-	-
ATCC13032 (pCS2)	3,9	0,013	55	55	28	56	+	+
ATCC13032 (pCS21)	n.b.	0,016	46	50	24	n.b.	+	+
ATCC13032 pCS22	n.b.	0,015	40	41	22	n.b.	+	+
ATCC13032 (pCS23)	0,03	0,014	51	57	30	56	+	+
ATCC13032 (pCS24)	2,07	0,011	65	65	40	62	+	+
ATCC13032 (pCS26)	1,88	0,015	64	63	39	60	+	+
ATCC13032 (pCS231)	0,060	0,013	11	14	4	10	-	-
ATCC13032 (pCS232)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	-	n.b.
ATCC13032 (pCS233)	n.b.	0,011	56	62	36	57	+	n.b.
DM58-1 (pZ1)	0,330	0,009	83	100	79	93	+	+
Abkürzungen: ASA-DH: Aspartyl-β-semialdehyd Dehydrogenase								
AK : Aspartat-Kinase								
n.b. : nicht bestimmt								

4. Sequenzierung eines DNA Fragments von Plasmid pCS24, welches d n Phänotyp AEC-Resistenz vermittelt.

4.1 Sequenziermethode

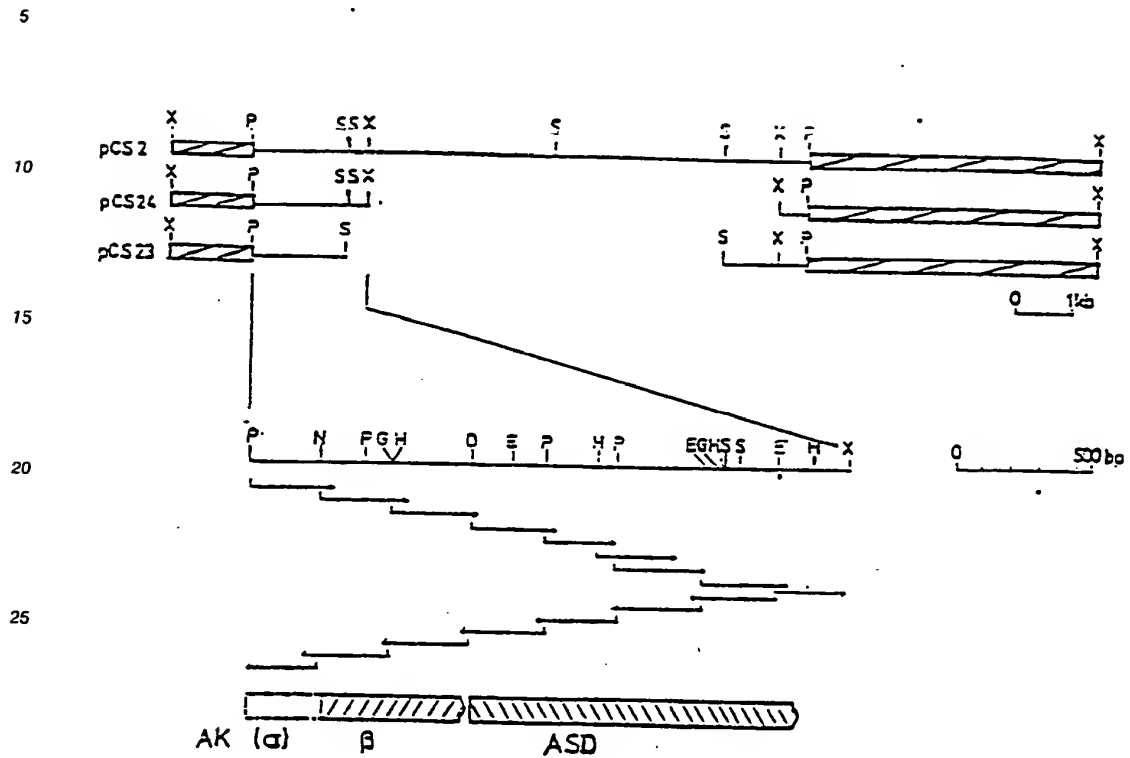
Die Nukleotidsequenz des 2.1 Kb PstI-XhoI-DNA-Fragments wurde nach der Methode von Maxam und Gilbert (Maxam, A.M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 560-564 (1977)) mit den Modifikationen von Arnold und Pühler (Arnold, W. et al., Gene, 70,171 ff (1988)) bestimmt. Die Subklonierung zur Sequenzierung ging dabei vom Plasmid pCS24 aus (Abb. 4). Dieses wurde nach E. coli MM 294 (Merelson, M. et al., Nature 217, 1110-1114 (1968)) transformiert und entsprechende Fragmente in die Sequenziervektoren pSVB21, 25 und 26 (Arnold, W. et al., Gene, 70,171 ff (1988)) kloniert. Im E. coli-Stamm JM83 (Messing, J., Recombinant DNA Technical Bulletin NIH Publication No. 79-99 2, 43-48 (1979)) konnte Insertionsinaktivierung mittels XGal-Test (5-Bromo-4-chloro-indolyl- β -D-galactopyranosid) nachgewiesen werden.

Die Sequenzierstrategie ist in Abb. 4 wiedergegeben. Die Nukleotidsequenz wurde von beiden DNA-Strängen mit überlappenden Klönen ermittelt.

4.2 DNA-Sequenz des 2.1 Kb Pst I- Xho I - DNA Fragments

Das sequenzierte DNA-Stück ist 2112 bp lang. Es trägt Restriktionsschnittstellen für die Enzyme BgIII, DraI, EcoRI, HindIII, NaeI, PstI, SalI und XhoI, mit denen auch die Subklone hergestellt wurden (Abb. 5). Die Nukleotidsequenz wurde mit dem Sequenzanalyse-Programmpaket ANALYSEQ (Staden, R. et al., Nucl. Acids Res. 14, 217-232 (1986)) bearbeitet.

Abb. 4 Deletionsanalyse und Sequenzierstrategie des chromosomalen Fragments des Plasmids pCS2.



Deletionsanalyse: die Plasmide pCS23 und pCS24 vermitteln ebenso wie der Klon pCS2 AEC-Resistenz und Lysin-Produktion. Die schraffierten Balken stellen den Vektoranteil der Plasmide dar.

Sequenzierstrategie: das 2.1 kb *Pst*I-*Xho*I-Fragment des Plasmids pCS24 wurde mit den eingezeichneten Restriktionsschnittstellen subkloniert. Die Pfeile geben jeweils den sequenzierten Bereich und die Leserichtung an. Eingezeichnet sind die Restriktionsschnittstellen der Enzyme *Dra*I (D), *Eco*RI (E), *Bgl*II (G), *Hind*III (H), *Nae*I (N), *Pst*I (P), *Sal*I (S) und *Xho*I (X). Darunter sind die 2 offenen Leseraster gezeigt, die für die Untereinheiten der Aspartatkinase und für Aspartat- β -Semialedehyd-Dehydrogenase codieren (s. Text).

Es finden sich 2 lange offene Leseraster (ORF) auf dem sequenzierten DNA-Stück. Beide sind von der *Pst*I-Schnittstelle zur *Xho*I-Schnittstelle hin angeordnet. Es befindet sich nur ein kleiner Bereich von 26 bp zwischen beiden. Vor dem 2. ORF befindet sich eine Ribosomenbindungsstelle (RBS) (806-809 AGGA gefolgt von dem Startcodon ATG). Ebenso wurde innerhalb des 1. ORF's eine RBS lokalisiert (AGGA, 268-271 mit Startcodon GTG).

Der ORF1 hat eine Länge von 264 Aminosäuren (AS), gerechnet von der *Pst*I-Stelle und von 172 AS (entsprechend 18.6 k Dals) von der internen RBS aus. ORF2 ist 342 AS (36,1 K Dals) lang.

Direkt hinter dem ORF2 befindet sich eine mögliche Transkriptionsterminationsstruktur, eine sogenannte Haarnadelschleife, gefolgt von mehreren Thyminresten (1864-1900). Diese Anordnung ist charakteristisch für ρ -unabhängige Terminationssignale in *E. coli* und anderen Bakterienspezies (Ahyda et al. Ann. Rev.

5 AlaGlyAlaThrValValAspAsnSerSerAlaTrpArgLysAspAspGluValProLeuIleValSerGluValAsnProSerAspLys
 TGCAGCGCGCAGTCTTGTGGATAACTCTTCTGCTTGGCCGCAAGCAGGAGGTTCCACTAATCGTCTCTGACGTTGAACCGTTCCGACAA
 1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170

AspSerLeuValLysGlyIleIleAlaAsnProAsnCysThrThrMetAlaAlaMetProValLeuLysProLeuHisAspAlaAlaC1
 GGATTGCGCTCGTCAAGGGCAATTATTGCGAAGGCTAACTGCACGACGATGGCTGGCATGCCAGTGTGAAGCCACTTCACGATGCCGCTGC
 1180 1190 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260

10 LeuValLysLeuHisValSerSerTyrGlnAlaValSerGlySerGlyLeuAlaGlyValGluThrLeuAlaLysGlnValAlaAlaVa
 TCTTGTAAAGCTTACGCTTTCTCTTACCAGGCTGTTTCCGGTTCTGCTCTTGCAGGTGTGGAAGCTTGGCAAAGCAGGTTGCTGCACT
 HindIII 1280 1290 1300 1310 1320 1330 1340 PstI

15 GlyAspHisAsnValGluPheValHisAspGlyGlnAlaAlaAspAlaArgCysArgThrLeuCysPheThrAsnArgLeuGlnArgAl
 TGGAGACCACACGTTGAGTTGCTCCATGATGACAGGCTGCTGACGGCGATGTCCGACCTTATGTTTCACCAATCGCTTACACGCTGC
 1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440

20 AlaIleAlaGlyAsnLeuValAspAspGlyThrPheGluThrAspGluGluGlnLysLeuArgAsnGluSerArgLysIleLeuGlyLe
 TGGCATCGCCGAAACCTCGTCGATGACGGGACCTTGGAAACGATGAAGAGCAGAAGCTGCCCAACGAATCGCGCAACATTCTGGGTCT
 1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520 1530

ProAspLeuLysValSerGlyThrCysValArgValProValPheThrGlyHisThrLeuThrIleHisAlaGluPheAspLysAlaI1
 CCCAGACGTCAAGCTCTGAGGACGCTGGGTTGGCGTGGCGGTTTTCAGCGGGCAGGCTGACCATTCACGGCGAATTGCAAGGCAAT
 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600 EcoRI 1620

25 ThrValAspGlnAlaGlnGluIleLeuGlyAlaAlaSerGlyValLysLeuValAspValProThrProLeuAlaAlaAlaGlyIleAs
 CACCGTCGACCGGGCAGGAGATCTTGGGTGGCGGTTTCAGGCGTGAAGCTTGTGAGGTCGCAAGCCCACTTGCAGCTGGCGGCAATTGA
 1620 1640 BglIII1650 1660 HindIII SalI 1690 1700 1710

30 GluSerLeuValGlyArgIleArgGlnAspSerThrValAspAspAsnArgGlyLeuValLeuValValSerGlyAspAsnLeuArgLys
 CGAATCGCTCGTTGACCGCATCCGTCAGGACTCCACTGTGACGACATAACGGCGGCTCTGCTTCTGCTGCTATCTGGGACAACCTCGGCAA
 1720 1730 1740 SalI 1760 1770 1780 1790 1800

35 AsnAlaAlaLeuAsnThrIleGlnIleAlaGluLeuLeuValLys
 GAATGCTGGCGTAACACCATCCAGATCGCTGAGCTGCTGTTAAGTAAAAAGCCGCCATTAAAACTGGGCTTGAGTGTACACTTTAA
 1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890

CGCGGCTTTTAAATGTTTGAAGGGCGATGGGGCTGAGCTTGTGAAGTGGAAATCTGCACAAGTTTAAAGTTTCTTTAGCAGGGGAAACAC
 1900 1910 1920 1930 EcoRI 1950 1960 1970 1980

40 TGCTGATAGCGCTAGGGATAAAGACATGAAAAATGCAACGGAGCTAGCGGCGGAAGCTTACGGGATGTCATTTTTCAGTGGAAAACTC
 1990 2000 2010 2020 2030 HindIII 2050 2060 2070

GGTCTACCGACCGCTTATAGTGTGCATCCATCCAGCTCGAG
 2080 2090 2100 XhoI

45 Die Aminosäuresequenzen von ORF1 (1-794) und ORF2 (821-1846) sind im 3-Buchstaben-Code
 angegeben. Die Nummerierung unterhalb des DNA-Stranges bezieht sich auf die DNA-Sequenz.
 Die Namen der zur Sequenzierung benutzten Klonierschnittstellen sind ebenfalls unterhalb
 eingetragen. Ribosomenbindungsstellen sind durch Sterne (*), Startcodons durch Pfeile
 (--->) und die Terminatorstruktur durch Balken (—) markiert.

4.3 Analyse der Aminosäuresequenz

55 Die von ORF1 und ORF2 translatierten Aminosäuresequenzen wurden mit den bekannten Sequenzen
 der Aspartat-Kinasen (AK) I (Cassan, M. et al., J. Biol. Chem. 261, 1052-1057 (1986)) von E. coli und der AK
 II von B. subtilis (Chen, N.-Y. et al., J. Biol. Chem. 262, 8737-2255 (1987)) bzw. den AS-Sequenzen der
 Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenasen (ASA-DH) von E. coli (Haziza, C. et al., Embo J, 1, 379-384 (1982))

und *Streptococcus mutans* (Cardineau, G.A. et al., J. Biol. Chem. 262, 7, 3344-3353 (1987)) verglichen. Dazu wurden die Programme MALIGN (Sobel, E. et al., Nucl. Acids Res. 14, 363-374 (1986)) und DIAGON (Staden, R. et al. Nucl. Acid Res. 14, 217-232 (1986)) benutzt. Es zeigten sich signifikante Übereinstimmungen zwischen ORF1 und den AK-Sequenzen einerseits und ORF2 und der ASA-DH-Sequenz von *S. mutans* andererseits. Zur *E. coli* ASA-DH zeigten sich nur schwache Homologien, vornehmlich allerdings im Bereich des aktiven Zentrums (Haziza, C. et al., Embo J. 1, 379-384 (1982)).

Aus den Computeranalysen ergibt sich folgendes:

- ORF1 entspricht dem C. Terminus der Aspartat-Kinase, d.h. es fehlen etwa 160 AS vom N-Terminus sowie die komplette Promotorregion.

10 - ORF2 entspricht der Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase.

Die Homologie des ORF1 mit der *B. subtilis*-AK II ist für den Fachmann augenfällig. Die AK II besteht aus überlappenden Untereinheiten (Chen, N.-Y. et al., J. Biol. Chem 262, 8787-8798 (1987)). Dabei entspricht die β -Untereinheit dem C-Terminus der α -Untereinheit. Da die im ORF1 gefundene RBS in ihrer Position genau mit der RBS dieser AK übereinstimmt, kann im Analogieschluß gefolgert werden, daß hier 15 die klonierte β -Untereinheit der AK von *C. glutamicum* vorliegt.

5. Expressionsexperimente

20

5.1 Komplementation asd- und lysC-negativer Stämme von E. coli.

Die Identität des ORF2 mit dem asd-Gen konnte durch Komplementation des asd-negativen *E. coli*-Stammes RASA 6 (Richaud, F. et al., C.R. Acad. Sc. Paris, 293, 507-512 (1981)) durch die Plasmide pCS2 25 und pCS24 belegt werden. pCS23, bei dem etwa 50 Aminosäuren vom C-Terminus der ASA-DH fehlen, komplementiert nicht. Keines dieser Plasmide war in der Lage, den AKI-III negativen *E. coli* Gif 106 M1 (Boy, E. et al., Biochemie 61, 1151-1160 (1979)) zu komplementieren.

5.2 Bestimmung der spezifischen Aspartat-Kinase (AK) und Aspartyl- β -semialdehyd-Dehydrogenase (ASA-DH) in Transformanten von ATCC13032 mit verschiedenen pCS2 Deletionsderivaten.

Die unter 4.3 aus Homologievergleichen gefolgerten Analogieschlüsse, nach denen das PstI-XhoI Genfragment aus DM58-1 nur ein Teil des lysC Gens (AK), aber das vollständige asd-Gen beherbergt, 35 konnten durch Enzymmessungen eindeutig bestätigt werden.

Kein mit pCS2 oder einem pCS2 Derivat transformierter *C. glutamicum* ATCC13032 Stamm enthält eine gegenüber dem Empfängerstamm erhöhte Aspartat-Kinase Aktivität (Tabelle 4, Spalte 3).

Demgegenüber war in allen Transformanten, deren Plasmide das asd-Strukturgen enthielten, eine starke Überexpression der ASA-DH nachweisbar (Tabelle 4, Spalte 2, Abbildung 3 und 4). Die Plasmide 40 pCS23 und pCS23-Derivate führten erwartungsgemäß nicht zu einer Überexpression der ASA-DH. Aufgrund der hohen Labilität der ASA-DH schwanken die Faktoren der aus der spezifischen Aktivität kalkulierbaren Überexpression von 31 - 65.

45 6. Enzymeigenschaften und L-Lysin Ausscheidung

Die für ATCC13032 pCS2 nachgewiesene L-Lysin Ausscheidung von 7,1 g/l in 72 Stunden (Tabelle 2) läßt sich damit auf zwei gentechnisch realisierte Veränderungen zurückführen.

a) Klonierung der Regulationsuntereinheit der Aspartat-Kinase aus DM58-1 ohne Erhöhung des 50 zellulären Enzymgehaltes,

b) Klonierung der Aspartyl- β -semialdehyd-Dehydrogenase aus DM58-1, die zur 31-65fachen Erhöhung des zellulären Enzymgehalts führt.

55 Ansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von L-Lysin, dadurch gekennzeichnet, daß man rekombinante DNA, die aus einem DNA-Fragment, das eine für die Produktion von Proteinen, die zu einer Aspartyl- β -semialdehyd-

- Dehydrogenase (asd) Aktivität und/oder zur Deregulation der Aspartat-Kinase (lysC) führen, kodierende genetische Sequenz aufweist, die von einem Mikroorganismus der Gattung Corynebacterium oder Brevibacterium stammt, und aus Vektor DNA besteht, in einen Mikroorganismus der Gattung Corynebacterium oder Brevibacterium inseriert, denselben erhaltenen Transformanten in einem geeigneten Medium züchtet und das gebildete L-Lysin daraus abtrennt.
- 5 2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die rekombinante DNA aus einem in einem Mikroorganismus der Gattung Corynebacterium oder Brevibacterium replizierbaren Plasmid besteht.
3. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der in dem Plasmid enthaltende Vektor in einem Mikroorganismus der Gattung Corynebacterium oder Brevibacterium replizierbar ist und aus der Gruppe pZ1, pCV34, pCV36, pCVX4, pCVX10, pCVX15, pZ9, pZ8-1, pCV35, pECM1, pECM3 ausgewählt wird.
- 10 4. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die rekombinante DNA aus dem Plasmid pCS2 besteht, enthalten in Corynebacterium glutamicum DSM 5086.
- 15 5. Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die rekombinante DNA aus den aus dem Plasmid pCS2 abgeleiteten Derivaten pCS21, pCS22, pCS24, pCS26 besteht.
6. Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die rekombinante DNA aus den aus dem Plasmid pCS2 abgeleiteten Derivaten pCS23 oder pCS233 besteht.
- 20 7. Mikroorganismus der Gattung Corynebacterium oder Brevibacterium, enthaltend eine rekombinante DNA, die aus einem DNA-Fragment, das eine für die Produktion von Proteinen, die zu einer Aspartyl- β -semialdehyd-Dehydrogenase (asd) Aktivität und/oder zur Deregulation der Aspartat-Kinase (lysC) führen, kodierende genetische Sequenz aufweist, die von einem Mikroorganismus der Gattung Corynebacterium oder Brevibacterium stammt, und aus Vektor DNA besteht.
- 25 8. DNA-Fragment, enthaltend eine genetische Sequenz, die für die Produktion von Proteinen, die zu einer Aspartyl- β -semialdehyd-Dehydrogenase (asd) Aktivität und/oder zur Deregulation der Aspartat-Kinase (lysC) führen, in einem Mikroorganismus der Gattung Corynebacterium oder Brevibacterium kodiert, mit einer Länge von 9,9 kb, wie in Abb. 2 dargestellt.
- 30 9. DNA-Fragment gemäß Anspruch 8, im wesentlichen bestehend aus einer genetischen Sequenz, mit der Länge von 2,1 kb, begrenzt durch eine Pst I- und eine Xho I-Schnittstelle, gekennzeichnet durch die in Abb. 5 wiedergegebenen Aminosäuresequenzen.

35

40

45

50

55



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			EP 90102685.6
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (IM CI*)
D, X	<u>EP - A2 - 0 219 027</u> (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) * Patentansprüche *	1, 7, 8	C 12 N 15/11 C 12 P 13/08 C 12 N 1/21 C 07 H 21/04
A	<u>EP - A1 - 0 197 335</u> (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) * Patentansprüche 1-6, 9-11 *	1, 7, 8	//(C 12 N 1/21 C 12 N 1:15) (C 12 N 1/21 C 12 R 1:13)
D, A	<u>EP - A2 - 0 088 166</u> (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) * Patentansprüche 1-5, 9, 10, 12 *	1	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (IM CI*)
			C 12 N C 12 P C 07 H
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			
Recherchenort WIEN		Abschlußdatum der Recherche 12-06-1990	Prüfer WOLF
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			

EPA Form 1503 03 82